

(51)Int.Cl.⁸

識別記号

FI

C12N 15/00

C12N 15/00

A01K 67/027

A01K 67/027

C12N 5/10

C12N 5/00

B

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 25 頁)

(21)出願番号 特願平8-531983
 (86)(22)出願日 平成8年(1996)4月19日
 (85)翻訳文提出日 平成9年(1997)10月21日
 (86)国際出願番号 PCT/US96/05581
 (87)国際公開番号 WO96/33266
 (87)国際公開日 平成8年(1996)10月24日
 (31)優先権主張番号 08/426, 555
 (32)優先日 1995年4月21日
 (33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 セル ジェネシス, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94404,
 フォスターシティ, レイクサイド ドライ
 ブ 322
 (72)発明者 ジャコボビッツ, アヤ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94025,
 メンロパーク, モンタリー アベニュー
 2021
 (72)発明者 津田 弘久
 神奈川県平塚市岡崎5910-31
 (74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 大ゲノムDNA欠失の生成

(57)【要約】

本発明の方法は、遺伝子ターゲティングによりゲノムDNAの大フラグメントを欠失するための置換型標的化構築物の使用を提供する。選択マーカーを含み得る置換標的化構築物は、標的遺伝子座の5'および3'フランキンゲン配列に相同である配列の2つの領域を含むように構築される。標的化構築物の所望の細胞株へのトランスフェクション後、遺伝子標的化媒介性欠失は、選択によって同定され、そしてさらに特徴づけられる。適切な遺伝子座の例は、MHCクラスIおよびII抗原ならびに免疫グロブリン遺伝子(例えば、 κ 、 λ 、またはH鎖の可変領域および定常領域を含む)を含む。

【特許請求の範囲】

1. 15kbより大きいゲノム欠失を含む哺乳動物細胞を得る方法であって、ここで該方法は、野生型遺伝子座において欠失されるべき領域の5' および3' フランキング配列に相同である配列の2つの領域を含む構築物を導入することによって、該野生型遺伝子座を含む該細胞のゲノムを改変する工程を包含する、方法。

2. 前記標的遺伝子座がHPRT遺伝子座である、請求項1に記載の方法。

3. 前記標的遺伝子座がMHCクラスI遺伝子座である、請求項1に記載の方法。

4. 前記標的遺伝子座がMHCクラスII遺伝子座である、請求項1に記載の方法。

5. 前記標的遺伝子座が免疫グロブリン遺伝子座である、請求項1に記載の方法。

6. 前記哺乳動物細胞が、ランゲルハンス島、副腎髄質細胞、骨胚盤胞、破質細胞、上皮細胞、内皮細胞、Bリンパ球、Tリンパ球、ニューロン、膠細胞、神経節細胞、レチナール細胞、ケラチノサイト胚幹(ES)細胞、肝細胞、骨髓細胞、および筋細胞からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

7. 標的遺伝子座において15から約3000kbより大きい範囲内での欠失を有する哺乳動物細胞を得る方法であって、ここで該方法は、野生型遺伝子座の5' および3' フランキング配列に相同である配列の2つの領域を含む構築物を導入することによって、該野生型遺伝子座を含む該細胞のゲノムを改変する工程を包含する、方法。

8. HPRTが欠失した哺乳動物細胞を調製する方法であって、ここで、該方法は、改変DNAフラグメントを含む構築物を野生型HPRT遺伝子座を含む標的細胞に導入する工程を包含し、ここで該フラグメントは、該野生型HPRT遺伝子座が位置する

ゲノム部位に対応し、

ここで、該DNAフラグメントは、該野生型HPRT遺伝子座を含むネイティブDNA中の第一の配列の55kb上流の該野生型配列に一致するhpert遺伝子座の第2エクソンのすぐ下流の第一の配列を含む、方法。

9. 請求項1、7、または8に記載の方法であって、以下の工程：

a) 前記構築物中に存在する選択マーカーを含む細胞を選択することによって、

前記欠失を含む細胞を同定する工程；および

b) 該欠失を含む細胞を回収する工程、
をさらに包含する、方法。

10. 請求項1から9のいずれかに記載の方法によって調製される、哺乳動物細胞。

【発明の詳細な説明】

大ゲノムDNA欠失の生成

緒言

技術分野

本発明の分野は、置換型標的化構築物を用いる遺伝ターゲッティングを用いる大きなゲノムDNA欠失を生成することによる哺乳動物遺伝子のゲノムの改変である。

背景および関連文献

外因性DNAと内因性相同染色体配列との間の相同組換えによる遺伝子ターゲッティングは、マウス中の培養哺乳動物細胞（マウス胚幹細胞を含む）において設計された変異を作製するためまたは遺伝子変異を訂正するための、そして「標的化E細胞の注入」の際にマウス生殖系列中にこれらの変異を伝達するための卓越した道具であることが判明している（Smithiesら、Nature, 317:320-234, 1985; Thomasら、Cell, 51:503-512, 1987; Kollerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:8927-8931, 1989; Kuhnら、Science, 254:707-710, 1991; Thomasら、Nature, 346:847-850, 1990; Schwartzbergら、Science, 246:799-803, 1989; Doetschmanら、Nature, 330:576-578, 1987; Thomsonら、Cell, 56:313-321, 1989; Sheselyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:4294-4298, 1991）。遺伝子ターゲッティングによって大きな欠失を作製する能力は、特に遺伝子クラスターおよび／または多コピーを含む大きな遺伝子または複合遺伝子座に関して非常に有用であることが当該分野において十分理解されている。これらの遺伝子において、完全なターゲッティングは、通常、ES細胞のより長い継代を必要とするディファレンシャルマーカールを用いる連続的ターゲッティングを必要とする。この間に、生殖系列への伝達能力は減少され得る。初代哺乳動物細胞についても、より長い継代はそれらの分化する性質に影響し得る。良好なサイズの15kbの欠失が、T細胞抗原レセプターβサブユニット遺伝子

座中で達成されたが（Mombaertsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:3084-3087, 1991）、それによってより長いゲノム欠失が達成し得る方法のために顕著な必要性が残っている。

発明の要旨

本発明は、野生型遺伝子座において欠失されるべき領域の5' および3' フランキング配列に相同である配列の2つの領域を含む標的化構築物を誘導することによって、野生型遺伝子座を含む細胞のゲノムを改変する工程を包含する、標的遺伝子座において15kbよりも大きい欠失を有する哺乳動物細胞を得る方法を提供する。この方法は、選択薬剤を含む培地中で改変細胞を培養する工程、および上記の欠失を含む細胞を回収する工程をさらに含む。本発明の方法における標的遺伝子座は、任意の遺伝子座（例えば、HPRT、MHCクラスIおよびクラスIIまたは免疫グロブリン遺伝子座）であり得るが、これらに限定されない。本発明の哺乳動物細胞は、初代細胞または形質転換細胞株のいずれかであり得、そして例えば、ランゲルハンス島、副腎髄質細胞、骨胚盤胞、破質細胞、上皮細胞、内皮細胞、Bリンパ球およびTリンパ球、ニューロン、膠細胞、神経節細胞、レチナール細胞、胚幹(ES)細胞、肝細胞、骨髓細胞、ケラチノサイト、および筋芽（筋）細胞を含む任意の細胞型を含み得る。

より詳細には、本発明はまた、hp_rtが欠失した哺乳動物細胞（ES細胞を含む）を調製する方法を提供する。この方法は、野生型hp_rt遺伝子座を含む標的細胞へ野生型hp_rt遺伝子座が位置するゲノムに相当する、改変DNAフラグメントを含む標的化構築物を導入する工程を包含する。ここで、改変DNAフラグメントは、野生型hp_rt遺伝子座を含むネイティブDNA中の第一の配列の55kb上流の野生型配列に一致するhp_rt遺伝子座の第2エクソンのすぐ下流の第一の配列を含む。

図面の簡単な説明

図1は、以下の実施例1に記載の、正常マウスおよび変異体E14TG2a細胞中のhp_rt遺伝子座ならびに55kbを欠失するために使用された標的化構築物を示す（制限酵素部位：B；BamHI、C；ClaI、E；EcoRI、X；XhoI、SS；SalIおよびXmnI）。

図2（aおよびb）は、以下の実施例1に記載の、E14.1、E14TG2a、pm4.2、およびpm5x.1細胞中のhp_rt遺伝子座のパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を示す。（図2a。DNAを、SacII（A,B）またはBssHII（E,F）で消化し、そして5' プロー

ブ(A, E)または3'プローブ(B, F)でプローブした) ; 図2b。E14.1およびpm4.2 ES細胞中のhprt遺伝子座中のSacIIおよびBssHII制限部位の略図。)

図3 (aおよびb) は、以下の実施例1に記載の、標的化構築物 (pMp4) を用いる、遺伝子標的化した55kb欠失によるマウスhprt遺伝子座の不活化を示す。(図3a。分析のために使用したプローブ (5' および3' プローブ) ならびにE14.1細胞、E14TG2a細胞および得たれた標的化クローン中の標的化領域の周囲のhprt遺伝子の構造: B; BamHI、C; ClaI、X; XhoI、R; RsaI、jx; 連結部およびEx; エクソン; 図3b。E14.1、E14TG2a、ならびに標的化ESクローンpm4.2およびpm5x.1中のhprt遺伝子座のサザンブロット分析。DNAを、BamHI (A, B) またはBamHI/ClaI (C, D) で消化し、そして5' プローブ(A, C) または3' プローブ(B, D) でプローブした。)

特定の実施態様の詳細な説明

本発明の方法は、遺伝子ターゲティングによるゲノムDNAの大きなフラグメントを欠失するための置換型標的化構築物の使用を提供する。選択マーカーを含み得るこの置換標的構築物は、標的化遺伝子座の5' および3' フランキング配列に相同である配列の2つの領域を含むように構築される。標的構築物の所望の細胞株へのトランスフェクションの後、遺伝子標的化媒介性欠失を、選択によって同定し、そしてサザンブロット分析およびパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) によってさらに特徴づけ得る。

本発明が、任意の目的 (例えば、研究、治療、および細胞株またはトランスジェニック哺乳動物の産生を含む) のために大きなゲノム欠失を作製しようとする任意の遺伝子座における欠失の生成のために使用され得ることを強調すべきである。適切な遺伝子座の例としては、T細胞レセプター、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラスIおよびクラスII抗原、ならびに免疫グロブリン遺伝子座 (例え

ば、 κ 、 λ 、またはH鎖遺伝子座の可変領域および定常領域をコードする遺伝子を含む) が挙げられる。遺伝子座のさらなる例としては、低密度リポタンパク質 (LDL)、アポリポタンパク質E、アポリポタンパク質B、第VIII因子、第IX因子、CS膜貫通調節タンパク質 (CS transmembrane regulator)、ジストロフィン

遺伝子が挙げられる。大きなゲノム欠失を含む細胞およびトランスジェニック哺乳動物は、遺伝子構造および機能または生化学的プロセス（例えば、タンパク質産生または阻害）を研究するために使用され得る。さらに、トランスジェニック哺乳動物は、細胞、器官、または組織の供給源として使用され得るか、またはヒトの疾患（例えば、筋ジストロフィー、免疫系異常、高コレステロール血症、血友病、および嚢胞性線維症）のモデル系を提供するために使用され得る。

トランスジェニック哺乳動物は、非ヒト哺乳動物、特に、非霊長類哺乳動物（例えば、実験動物（特に、マウス、ラット、モルモットなどの小実験動物）、家畜、ペットなど）であり得る。トランスジェニック哺乳動物は、薬物のスクリーニングのためまたは生化学的経路を研究するために実験的に使用され得る。トランスジェニック哺乳動物（好ましくは、マウス）はまた、PCT出願（PCT/US91/00245およびPCT/US93/06926、これらは、本明細書中にその全体が参考として援用される）に記載のように、異種の（好ましくは、ヒトの）抗体または改変抗体を産生するために使用され得る。大きなゲノム欠失が、マウス胚幹細胞中の内因性免疫グロブリン遺伝子座中に作製され、そして、別々の工程において、ヒトH鎖およびL鎖免疫グロブリン遺伝子複合体は、マウス生殖系列に導入される。これは、適切な真核微生物または原核微生物中にヒトH鎖およびL鎖免疫グロブリン遺伝子を再構築し、そして得られたDNAフラグメントを、受精卵母細胞または胚幹細胞（好ましくは、マウス由来の）の前核に挿入することによって達成される。改変された胚幹細胞に部分的に由来し、そして生殖系列を介して遺伝的改変を伝達し得るキメラマウスが生成される。ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含むマウス株と、マウス免疫グロブリン遺伝子座が欠失している株を有する株との交配は、純粋にヒトの抗体を産生するマウスを生成させる。

遺伝子ターゲティングに供され得る細胞は、任意の目的の哺乳動物細胞であり得、そして初代細胞および形質転換細胞株の両方を含み、それらは、細胞治療、

研究、インビトロでの他の細胞との相互作用などにおける使用が見出され得る。特に目的とする細胞としては、ランゲルハンス島、副腎髄質細胞、骨胚盤胞、破

骨細胞、上皮細胞、内皮細胞、Bリンパ球およびTリンパ球、ニューロン、膠細胞、神経節細胞、レチナール細胞、胚幹(ES)細胞、肝細胞、骨髓細胞、ケラチノサイトおよび筋芽(筋)細胞が挙げられるが、これらに限定されない。細胞は、哺乳動物宿主(好ましくはヒトであり、そしてマウスおよび他の齧歯類、ウサギ、ブタ、ネコ、ウシ、イヌなどもまた含む)から得られ得る。

置換標的化構築物は、その発現を防止するために、内因性遺伝子(単数または複数)の少なくとも1つ(好ましくは、両方)のコピーに欠失を導入する目的のための、選択された遺伝子座の内因性遺伝子(単数または複数)の少なくとも一部を含む。欠失が、不活化される遺伝子の1つのコピーのみに導入される場合、標的遺伝子の1つの変異されていないコピーを有する細胞は拡大され、そして第二の標的化工程に供され得る。ここでこの欠失は、第一の欠失と同一であるかまたは異なり得、そして元に導入された欠失の少なくとも一部と重複し得る。この第二の標的化工程において、相同性の同一のアームを有するが、異なる哺乳動物選択マーカー(例えば、ハイグロマイシン耐性遺伝子(hyg^r))を含む標的化構築物を使用され得、ホモ接合型欠失を含むクローンが生成され得る。得られた形質転換体は、ネガティブまたはポジティブ選択マーカーの使用のような標準的な手順によりスクリーニングされ、そして細胞のDNAは、野生型標的遺伝子の非存在を確認するために、サザンブロッティングのような標準的な手順によりさらにスクリーニングされる。あるいは、ES細胞が標的化され、そして欠失についてのヘテロ接合型であるマウスを生成させるために使用される場合、欠失についてのホモ接合型は、ヘテロ接合型マウスを交雑することにより、達成され得る。

それによってホモ接合型欠失が、第二の標的化工程の使用なしに哺乳動物細胞中に作製され得る別の手段は、PCT出願(PCT/US93/00929、これは、本明細書中にその全体が参考として援用される)に記載の、遺伝子標的化事象のホモ部分二倍体化(homogenotization)を包含する。この方法において、標的化構築物は、第一の標的化工程において細胞に導入され、所望のゲノム欠失を作製する。次いで、この細胞を、遺伝子標的化組換え体についてスクリーニングし、そしてこの組換え

え体を、増幅以外によって複数のコピーの選択因子を有する細胞について選択するために、マーカー遺伝子について上昇したレベルの選択薬剤に曝露する。次いで、この細胞を、標的遺伝子座でのホモ接合性について分析する。

標的化構築物の細胞内への所望の導入を提供するDNAベクターを、使用し得る。この構築物は、構築物の調製、増幅、宿主細胞のトランスフェクション、および構築物の宿主細胞への組み込みについての使用が見出され得る欠失標的化構築物以外の機能的物質を含むように改変され得る。

置換標的化構築物は、1つの部位での欠失および選択マーカーの遺伝子を含む別の部位での挿入を含み得る。特に目的とするのは、マーカー（例えば、ネオマイシン耐性のような抗生物質耐性）を提供する遺伝子である。標的遺伝子中に挿入された選択マーカー遺伝子の存在は、標的ベクターの宿主ゲノムへの組み込みを確立する。しかし、DNA分析が、相同組換えまたは非相同組換えが生じたかどうかを確立するために必要とされる。このような欠失が導入される場合、これは、インサートにするプローブを使用し、次いで、構築物のフランキング領域を越えて広がるDNAの存在についてインサートに隣接する5' および3' 領域を配列決定するか、または欠失の存在を同定することによって決定され得る。

置換標的化構築物を哺乳動物細胞に導入するために使用され得る技術としては、リン酸カルシウム/DNA共沈、DNAの核へのマイクロインジェクション、エレクトロポレーション、インタクトな細胞との細菌プロトプラスト融合、トランスフェクション、リポフェクションなどが挙げられる。DNAは、一本鎖または二本鎖、直鎖状または環状、弛緩DNAまたは超らせんDNAであり得る。哺乳動物細胞をトランスフェクトするための種々の技術については、Keownら、Methods in Enzymology (1990)、第185巻、527～537頁を参照のこと（これは、本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。

ゲノム欠失は、15 kbより大きく、そして好ましくは、50 kb～3000 kbの範囲内である。この欠失は、通常、1つ以上のエクソンの一部、1つ以上のイントロンの一部を含むコード領域の少なくとも一部を含み、そしてフランキング非コード領域（特に5' 非コード領域（転写調節領域））の一部を含んでもよくまたは含まなくてもよい。従って、相同領域は、コード領域を越えて5' 非コード領域

へあるいは3'非コード領域へ広がり得る。相同配列は、少なくとも約500 bpを含むべきである。

標的遺伝子構築物の上流および／または下流には、二重交差が生じたかどうかの同定を提供する遺伝子が存在し得る。この目的のために、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子を使用し得る。なぜなら、チミジンキナーゼ遺伝子の存在は、機能的なHSV-tk遺伝子を含む細胞に対するそれらの細胞傷害性効果について、ヌクレオチドアナログ（例えば、アシクロビルまたはガンシクロビル）の使用により検出され得るからである。それらのヌクレオチドアナログに対する感受性の非存在は、チミジンキナーゼ遺伝子の非存在を示し、従って、この場合相同的組換えが生じ、二重交差事象もまた生じたことを示す。

標的化構築物は、哺乳動物宿主細胞中で機能的である複製系をさらに含み得る。大部分の場合、これらの複製系は、ウイルス複製系（例えば、シミアンウイルス40、エプスタインバーウイルス、乳頭腫ウイルス、アデノウイルスなど）を含む。

遺伝子の性質に依存して、インサート、および／またはフランキング遺伝子として選択マーカー遺伝子が含まれる場合、これは、野生型転写調節領域（特に、転写開始調節領域（例えば、プロモーターまたはエンハンサー））、あるいは異なる転写開始領域を有し得る。遺伝子が、転写開始領域（プロモーター）が、哺乳動物宿主細胞の転写機構によって認識さない宿主由来である場合はいつでも、異なる転写開始領域（プロモーター）が必要とされる。この領域は、構成性または誘導性であり得る。広範な種々の転写開始領域が単離されており、そして異なる遺伝子で使用されている。特に目的とするのは、哺乳動物宿主由来のメタロチオネインIおよびIIのプロモーター、チミジンキナーゼ、 β アクチン、免疫グロブリンプロモーター、ヒトサイトメガロウイルスプロモーター、SV40プロモーター、およびポリオーマウイルスプロモーターである。プロモーターに加えて、野生型エンハンサーが存在し得るか、または異なる遺伝子由来のエンハンサーが、プロモーター領域に連結され得る。

標的化構築物は、原核生物（特に*E. coli*）のための複製系をさらに含み得る。この系は、ベクターの調製、各操作後のクローニング、分析（例えば、制限マッ

ピングまたは配列決定)、クローンの拡大およびさらなる操作のためのプラスミドの単離に使用され得る。必要な場合、異なるマーカーを、細菌形質転換体を検出するために使用し得る。

一旦標的化構築物が調製されると、これは細菌配列の直鎖化の欠失によってさらに操作され得る。ここで、小さな欠失(例えば、60 bp)が、相同配列中に提供され得る。小さな欠失は、一般に、標的化構造遺伝子の一方または他方の末端付近に存在する。このような調製の後、構築物は、今や標的化細胞中に導入される用意ができています。既に示したように、DNAを標的細胞中に導入するための便利な任意の技術を使用し得る。標的化構築物の導入後、標的化細胞を、既に示したように、ポジティブおよび/またはネガティブマーカー(例えば、ネオマイシン耐性およびアシクロビルまたはガンシクロビル耐性)によって選択し得る。次いで、所望の表現型を示すこれらの細胞を、制限分析、サザン分析、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)などによりさらに分析し得る。標的遺伝子部位での欠失(単数または複数)の存在を示すフラグメントを同定することによって、相同組換えが生じて、標的遺伝子の2つのコピーのうち1つが不活化された細胞を同定し得る。特に、PCRを、遺伝子ターゲッティング生じた細胞を検出することにおいて有利に使用し得る。構築物内の配列に相補的なおよび構築物の外側かつ標的遺伝子座における配列に相補的なプライマーが使用され得る。この方法において、相同組換えが生じた場合にのみ、相同鎖に存在するプライマーの両方を有するDNA二重鎖を得ることができる。プライマー配列または予想されたサイズのPCR産物配列の存在を実証することにより、相同組換えの発生が確認される。

第二の構築物は、選択マーカーを必ずしも必要としないことにおいて、第一の構築物とは異なる。なぜなら、標的遺伝子産物(例えば、*hprt*)の非存在が、マーカーとして使用され得るからである。従って、標的遺伝子を改変および不活化するために、挿入、欠失、または置換を再び使用し得る。

標的遺伝子が欠失している細胞およびMHCクラスIまたはII抗原、あるいは免疫グロブリン領域をコードする遺伝子を標的化するとき特に有用である細胞を検出するための別の方法は、標的化構築物およびELISAを基本とする検出系の使用

を包含し、これは独立に標的化された多くのクローンの迅速な検出を可能にする。この方法において、相同的組換えのための部位を、エピトープ（例えば、CD4）を含むタンパク質のドメインに融合された、強力なエンハンサー/プロモーター（例えば、ヒトCMVエンハンサー）によって駆動される組換え融合タンパク質を作製するために設計する。エピトープは、それが結合するリガンド（例えば、抗体）によって、検出され得る。ここで、組換え融合タンパク質は、正確に標的化された細胞によって分泌され、次いで、分泌された融合タンパク質を認識する抗体を用いたELISAを基本とする系を用いて検出される。この方法において、組換え遺伝子座の5'末端は、標的化構築物に由来し、一方、遺伝子座の3'末端は、標的遺伝子に由来する。全体の5'末端を実験的に制御するので、組換え融合タンパク質の発現レベルおよび最終的な輸送の結果（fate）の両方を指向し得る。 β_2 -ミクログロブリンエピトープを含むタンパク質をトラップし、そしてCD4エピトープを含むタンパク質を検出するELISAにおいて、融合タンパク質を検出するために培地をスクリーニングする。この方法は、ES細胞を含む他の哺乳動物細胞型のために使用され得る。CD4エピトープに加えて、リガンド（例えば、エピトープに結合する抗体）によって認識されるエピトープを含む他のペプチドを、融合タンパク質において使用し得る。

胚幹細胞（特に、マウス宿主由来のES細胞）が標的されている場合、トランスジェニック動物を生成させるためにこのような細胞を使用することが所望され得る。このような手順のために、標的化構築物のES細胞への導入後、細胞を適切な培地（例えば、ウシ胎児血清を含有するDMEM培地）中の支持細胞層上にプレーティングし得る。ES細胞は、標的化された単一の遺伝子座（ヘテロ接合型）または標的化された両方の遺伝子座（ホモ接合型）を有し得る。構築物を含有する細胞を、選択培地を使用することによって検出し得、そしてコロニーが成長するための十分な期間後、コロニーを拾い、そして遺伝子ターゲッティングの発生について分析し得る。前記のように、構築物の配列内および配列外のプライマーを用いるPCR、あるいはサザンブロット分析またはPFGEを、しかし標的遺伝子座で使用する。次いで、遺伝子ターゲッティングを示すこれらのコロニーを、マウス胚盤胞中への注射に使用し得る。胚盤胞は、排卵後3.5日に子宮をフラッシュする

ことにより、4～6週齢の過剰排卵された雌から得られ得る。次いで、ES細胞をトリプシン処理し、そして改変細胞を胚盤胞を含む小滴に添加し得る。少なくとも1個、通常少なくとも約10個かつ約30個までの改変胚幹細胞を、胚盤胞の分割腔に注射し得る。注射後、少なくとも1個かつ15個以下の胚盤胞を、偽妊娠した雌の各子宮角に戻す。次いで、雌を予定日に進行させ、そして得られた同産児を遺伝子標的化された欠失を含む変異体細胞についてスクリーニングする。

ヘテロ接合型の子孫は、異なる被覆の色（キメラ子孫）を生じる胚盤胞およびES細胞の異なる遺伝子型を提供することにより容易に検出され得る。特に有用な表現型は、毛の色であるが、任意の表現型を使用し得るか、または所望される場合、改変されたゲノムDNAの存在についてプローブして遺伝子型を調査し得る。子は、通常、胚盤胞の養母への導入後16～18日で生まれる。ヘテロ接合型の動物を、標的化されたゲノム欠失の存在についてスクリーニングし、そして欠失を含む雄と雌とを、欠失についてホモ接合型である動物を生成するために交配する。

ここで、一般に本発明を記載して、以下の実施例は、例示として提供するが、これが本発明を制限することを意図しない。上記および以下で引用された全ての刊行物は、本明細書に参考としてそれらの全体が援用される。

実験

実施例1：置換型遺伝子標的化構築物によるES細胞中のマウスhpert遺伝子中の55kbの欠失

材料および方法

細胞培養およびトランスフェクション

ES細胞株E14.1およびE14TG2aは、それぞれ、Rajewsky博士（Univ. Koln, Germany）およびHooper博士（Univ. Edinburgh, Scotland）から贈与された。ES細胞を、15%の熱不活化ウシ胎児血清（HYCLONE）、8 μ lの β -メルカプトエタノールおよび1,000U/mlの組換えLIF（Esgro）を含有する抗生物質を補充したダルベッコ改変培地中で増殖させた。細胞を、マイトマイシンC処理したマウス胚線維芽細胞の支持細胞層上で培養した。E14.1 ES細胞（ 2×10^7 /0.8ml）を、それぞれB
am

HI/XhoIおよびBamHI/SaII消化によりプラスミド (pMp4またはpMp5X) から切り出した15 μ gの標的化構築物の存在下で、Gene-pulser (BioRad) によって、250Vでかつ960 μ Fでエレクトロポレーションした。ヒトhpprtミニ遺伝子 (Reidら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:4299-4303, 1990) を、エレクトロポレーション (250V、500 μ Fまたは960 μ F) あるいはリポフェクション (Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7413-7417, 1987) によってES細胞にトランスフェクトした。

E14TG2a細胞中の欠失連結部を含むゲノムフラグメントのクローニングおよびマッピングならびに遺伝子ターゲッティング構築物の構築

BamHIで消化したE14TG2aおよび野生型ES細胞株由来のゲノムDNAの分析により、正常マウスDNA中に存在する7.0kbのフラグメントのかわりの、E14TG2a DNA中のエクソン2および3を含む新規の9.2kb BamHIが同定された。新規の9.2kbのフラグメントをクローン化するために、BamHI消化したE14.1. TG2a DNA由来のゲノムライブラリーを構築し、そして必要な配列を含むクローンをhpprt cDNAプローブへのハイブリダイゼーションによって同定した。エクソン3配列を含む9.2kbのフラグメントをクローン化し、そしてエクソン3のXhoI部位までの欠失連結部を含む7.0 kbのBamHI-XhoIフラグメントを、bluescript (Stratagene) 構築物中にサブクローン化してpMP4プラスミドを生成させた。

pMP4上に存在する相同性の長さを増大させるために、エクソン3の3' 末端およびいくつかのイントロン3配列を含む1.15kbのXhoI-EcoRIフラグメントを、正常なES細胞からクローン化し、そしてpMP4中のBamHI/XhoIフラグメントのその正常な位置に挿入し、pMP5を生成させた。pMP5Xを、EcoRIでpMP5を消化し、クレノウを用いて平滑末端を生成させ、そしてDNAを再連結してエクソン3の上流に唯一のXmnI部位を作製することにより構築した。2つの構築物pMP4およびpMP5Xを、E14.1 ES細胞中にE14TG2a欠失を再現するための遺伝子ターゲッティング実験における標的構築物として使用した。

HPRT標的化ESクローンの選択:

エレクトロポレーション後、 2×10^6 のE14.1 ES細胞を、支持細胞をコート

した90mmのプレート上に播種した。5~6日後、細胞をトリプシン処理し、そし

てゼラチンをコートした90mmのディッシュに 0.5×10^6 ES細胞/プレートの濃度で再播種した。6-チオグアニン (6-TG、 $5 \mu\text{g/ml}$) を添加し、そして培地を2日毎に交換した。選択開始の7~10日後、6-TG耐性ESコロニーを拾い、そして分析のために処理した。

6-TG耐性ESクローンの分析:

6-TG ESクローンから抽出したゲノムDNAを、種々の制限酵素で消化し、そして以下のプローブを用いたサザンブロット分析によって分析した: ATCCから得たマウスhprt cDNA; 5' プローブ-pMP4由来の400 bpのBamHI/PstIフラグメント (図3参照); および3' プローブ-E2 (マウスhprt遺伝子のイントロン3由来の250bpのRsaIフラグメント)。E14TG2aおよび遺伝指標的化ESクローン中のHPRT欠失のサイズを、CHEF DR II (BioRad) を用いたPFGEによって決定した。電気泳動の条件は以下のとおりであった: 15秒の一定のパルス間隔; $0.5 \times \text{TBE}$ 中、200V、20~22°C、22時間。

ES細胞のマイクロインジェクションおよびマウス生成:

ES細胞のマウス胚盤胞へのマイクロインジェクション、キメラマウスの生成および飼育を、記載のように実施した (Bradleyら、Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells、Robertson, E. J. 編、(IRL Oxford、13~151頁、1987))。

結果および考察

第一のHPRT欠失ES細胞株E14TG2aを、E14 (129胚盤胞から単離されたES細胞株) の6-TG自発性変異体として選択した。E14TG2a中の獲得された変異の以前の特徴づけにより、これがhprt遺伝子の最初の2つのエクソン、そのプロモーター、および未決定的な長さの上流配列を除去した欠失として同定された。欠失のサイズは、20kbと評価されたが、その正確なサイズは決定されなかった。E14.1細胞において遺伝子ターゲティングによってE14TG2a変異を再現するために、変異体細胞株由来の欠失連結部を含むゲノムフラグメントをクローン化し、そして欠

失の正確なサイズを決定した。

E14TG2aのマッピング分析により、変異が、2および3にわたる7.0 kbの野生型フラグメントのかわりに9.2kbのBamHIフラグメントを生成したことが示された

(図1を参照のこと)。エクソン3配列を含む9.2kbのフラグメントを、E14TG2a BamHIゲノムライブラリーからクローン化し、そして欠失連結部領域をさらにマッピングおよびサイズ決定するために使用した(図1を参照のこと)。欠失サイズを、稀な制限酵素および3' および5' プローブを用いたハイブリダイゼーションを使用して(PFGE)決定した(図1を参照のこと)。E14.1およびE14TG2aから単離したScaII消化ゲノムDNAの5' プローブを用いるサザンブロットのハイブリダイゼーションにより、それぞれ、170 kbおよび115 kbのフラグメントが示された(図2Aを参照のこと)。3' プローブを用いるこのブロットのハイブリダイゼーションにより、同じ170 kbおよび115 kbのフラグメントが検出され、このことは、ScaIIフラグメントが欠失領域全体にわたり、そしてE14TG2aにおける55 kbの欠失サイズを示すことを示唆する。欠失サイズを、両方の細胞株由来のBssHII消化DNAの分析によってさらに確認した。単一の125 kbのフラグメントが、5' および3' プローブによってE14TG2a中に検出され、一方E14.1は、以下の二つのフラグメントを生じた:それぞれ5' および3' プローブによって検出された100 kbおよび80 kb。この分析により、欠失領域内のBssHII部位の存在が示され、そして欠失サイズが55 kbであることがさらに確認された。

E14.1細胞中のマウスHPRT遺伝子の55 kbの遺伝子標的化欠失

9.2 kbの欠失連結部クローンの7.0 kbのBamH-XhoIフラグメントを、bluescript構築物中にサブクローン化し、E14.1-hprt遺伝子座に対する6.6 kbの相同性を含むpMP4標的化構築物を生成した。さらに、第二の標的化構築物pMP5を、さらなる1.1 kbの3' 側の相同性を付加することにより構築した(図1を参照のこと)。エクソン3の0.25 kb上流に位置するEcoRIのかわりにXmnI部位を含みかつ選択マーカーを欠く二つの構築物(pMP4および改変したpMP5)を、置換型標的化構築物として使用し、遺伝子ターゲティングによるE14.1細胞中の55.0 kbの欠失を生成させた。この構築物を、E14.1細胞中にエレクトロプレートし(electroplat

e)、そして細胞を7~10日間6-TG選択に供し、それぞれ24および16の6-TG耐性クローンを生成させた。全てのクローンを拡大し、そしてそれらのゲノムDNAを3' プローブを用いたサザンブロット分析に供した。遺伝子標的化事象により

、ネイティブなE14.1細胞中の7.0のフラグメントに比較して、9.2 kbのBamHIフラグメントが生じるはずである。それぞれpMP4およびpMP5.2Xのエレクトロポレーションから生成した2つのクローンpm4.2およびpm5x.1は、予想されたBamHIパターンを示した(図3を参照のこと)。これらの9.2kbのフラグメントはまた、親株E14.1中の12kbのフラグメントを検出した5'プローブにハイブリダイズした。

上記2つのクローン(pm4.2およびpm5x.1)のさらなる分析を、BamHI-ClaI消化によって行った。3'プローブを用いたハイブリダイゼーションにより、E14TG2aについて検出されたものと同一であるが、E14.1中に存在しない、pm4.2およびpm5x.1クローン中の5.2 kbが示された。残りの9.2 kbのフラグメントは、おそらくメチル化の結果としての不完全なClaI消化から生じた。対照的に、5'プローブを用いたハイブリダイゼーションにより、予想されたように、4個全ての細胞株中の4.0 kbのBamHI-ClaIフラグメントの存在が示された(図3を参照のこと)。これらの結果は、pm4.2およびpm5x.1が、遺伝子ターゲッティング事象から得られた事を示す。

遺伝子標的化された55 kb欠失のさらなる確認は、PFGE分析から得られた(図2を参照のこと)。ScaIIおよびBssHIIを用いた消化の際、クローン(pm4.2およびpm5x.1)は、E14TG2aについて検出されたフラグメントとサイズが同一であるフラグメントを生じた。このことは、ES細胞における遺伝子ターゲッティングによるE14TG2a欠失の再現を示す。

本発明者らは、前記実施例中で、15 kbより大きな欠失が、比較的簡単な置換型構築物を用いることによって作製され得ることを実証した。この実施例において、hp^rt遺伝子を、hp^rt欠失E14TG2a細胞由来の置換構築物を用いて標的化した(Hooperら、Nature, 326:292-295 1987)。この分野の他者がhp^rt遺伝子を標的化した、達成された欠失は、1~2 kbおよび19kbのオーダーであり、これらは、本発明者らが実証した欠失よりも顕著に小さい(Thomasら、Cell, 51:503-512, 1

d Cell. Bio. 14:2402-2410, 1994)。置換構築物を用いて、本発明者らは、hprt 遺伝子座中の55 kbの欠失を作製した。これらの結果は、置換型構築物を使用し、大きなDNAフラグメントを欠失し得ること実証する。

上記発明を、理解を明瞭にする目的のために例示および実施例によっていくらか詳細に記載したが、本発明の教示を考慮すれば、特定の改変および変形が、添付の請求項の精神または範囲から逸脱することなくそれに対してなされ得ることは当業者に容易に明らかとなる。

【図1】

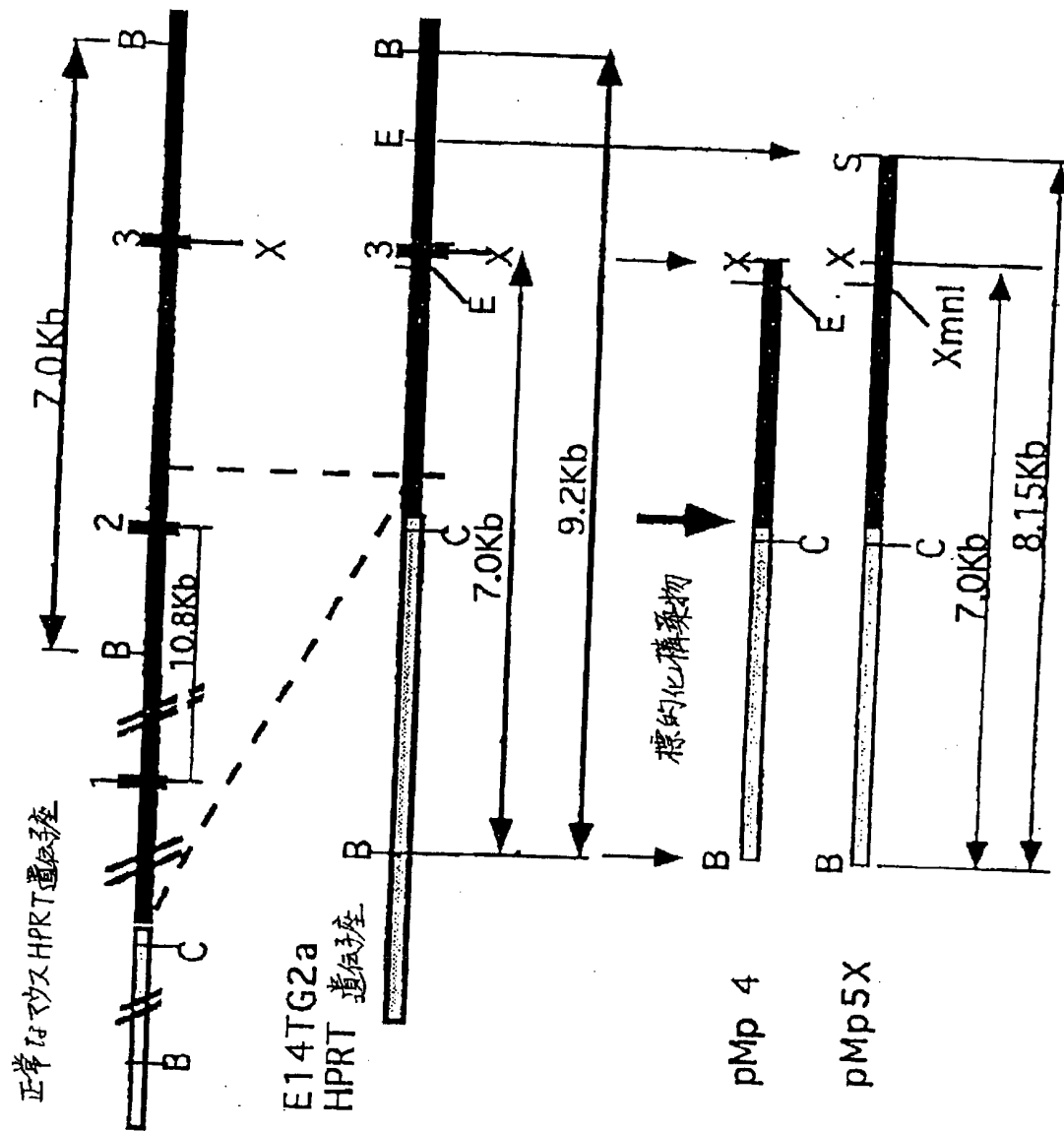
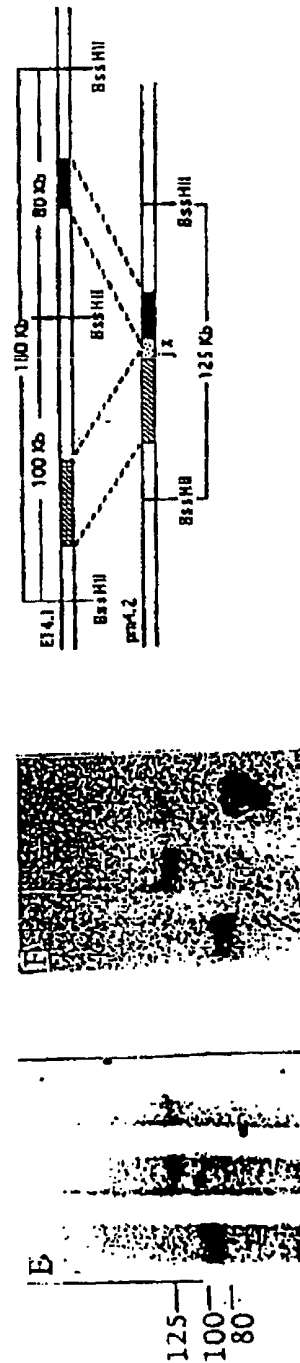


Figure 1

Figure 2



【图3】

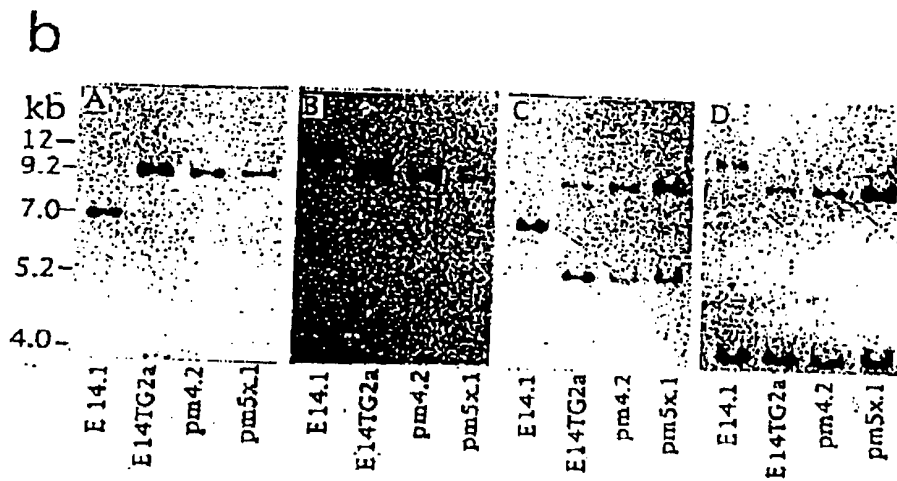
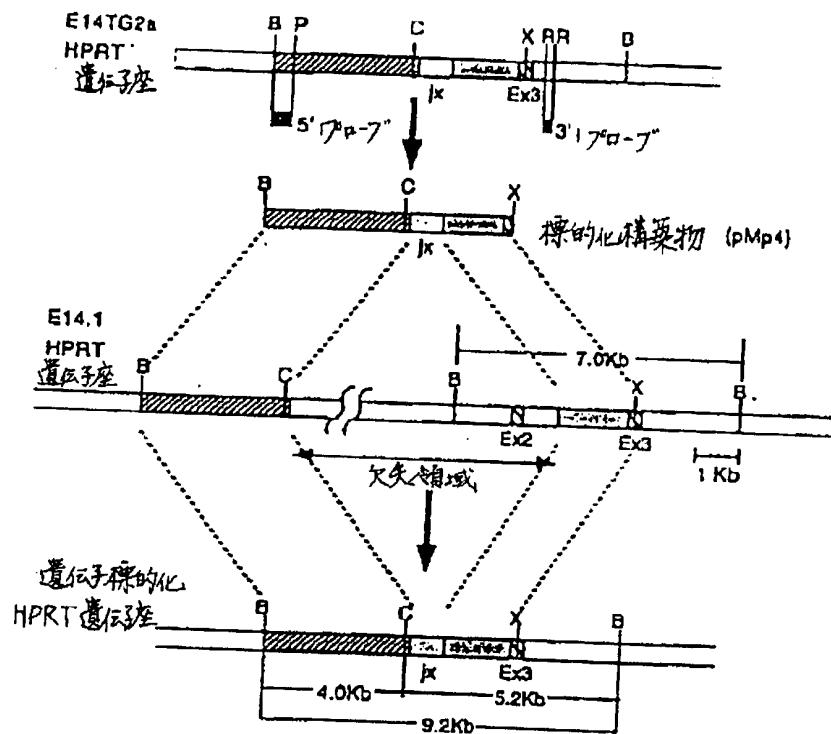


Figure 3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/05581

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(6) : C12N 5/06, 15/00 US CL : 435/172.3, 240.2 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/172.3, 240.2		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, MEDLINE, BIOSIS, WPIDS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHANG et al. Targeting Frequency for Deletion Vectors in Embryonic Stem Cells. Molecular and Cellular Biology. April 1994, Volume 14, No. 4, pages 2402-2410.	1-2, 6-9
---		-----
Y		1-9
Y	LANG et al. Replacement-Like Recombination Induced by an Integration Vector with a Murine Homology Flank at the Immunoglobulin Heavy-Chain Locus in Mouse and Rat Hybridoma Cells. Molecular and General Genetics. March 1994, Vol. 242, pages 528-538, especially pages 528-532.	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 08 JUNE 1996		Date of mailing of the international search report 15 JUL 1996
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer THANDA WAI Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/05581

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZIMMER et al. Gene Targeting Constructs: Effects of Vector Topology on Co-Expression Efficiency of Positive and Negative Selectable Marker Genes. Biochemical and Biophysical Research Communications. 15 June 1994, Vol. 201, No. 2, pages 943-949.	1-9
Y	DETLOFF et al. Deletion and Replacement of the Mouse Adult -Globin Genes by a "Plug and Socket" Repeated Targeting Strategy. Molecular and Cellular Biology. October 1994, Vol. 14, No. 10, pages 6936-6943.	1-9
Y, P	US 5,413,923 A (R. KUCHERLAPATI) 09 May 1995, page 1, abstract.	1-9
Y, P	US 5,468,629 A (C. CALHOUN) 21 November 1995, page 1, abstract.	1-9
Y, P	US 5,416,260 A (B.H. KOLLER) 16 May 1995, page 1, abstract.	1-9
A	ARATANI et al. End Extension Repair of Introduced Targeting Vectors Mediated by Homologous Recombination in Mammalian Cells. Nucleic Acids Research. 25 September 1992, Vol. 20, No. 18, pages 4795-4801.	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/05581

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 10
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L U, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, S Z, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, I S, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, S D, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN

